

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590205

研究課題名(和文) 脳エネルギーの代替にケトン体を利用するアルツハイマー病の新規治療戦略

研究課題名(英文) New Therapy of Alzheimer's disease using ketone body as brain energy.

研究代表者

大和 進 (YAMATO, Susumu)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60057370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者では脳内エネルギーが不足状態にあると報告されており、脳内エネルギーを増加させることはアルツハイマー病の新規治療要因となると考えられる。本研究によって、ケトン体がエネルギー生成を増加させ、アルツハイマー病バイオマーカーであるアミロイドタンパク(Aβ42)を微減させる結果を得た。一方、茶由来ポリフェノールのカテキン類は、ケトン体生成酵素であるHMG-CoAリアーゼを阻害することが示された。

研究成果の概要(英文)：Several reports suggest that Alzheimer's disease patients lack the energy in the brain, therefore, increasing the energy level in brain can be expected for the new treatment of Alzheimer's disease. In this study, we demonstrate that acetoacetate and 3β-hydroxybutyrate, ketone bodies, significantly increased ATP level, and slightly decreased amyloid beta42 peptide(Aβ42), a biomarker of Alzheimer's disease. On the other hand, certain catechins inhibited the activity of HMG-CoA lyase, which is a key enzyme of the production of acetoacetate from 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ケトン体 アルツハイマー病 HMG-CoAリアーゼ アセト酢酸

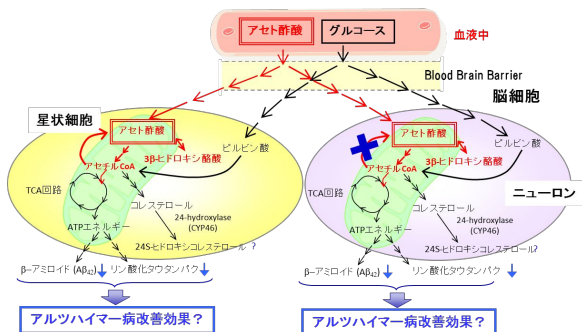
1. 研究開始当初の背景

脳内エネルギーは通常、主にグルコースから TCA 回路によって産生される。しかしながら、アルツハイマー病においては、グルコースからのエネルギー生成能が 17~24%ほど低下し、エネルギー不足になると報告されている。

一方、脳内ではグルコースのほかにケトン体(主にアセト酢酸)からエネルギーを獲得でき、特に星状細胞は、ケトン体合成も行える。ケトン体は HMG-CoA から HMG-CoA リアーゼによって産生されることから、HMG-CoA リアーゼおよびケトン体を促進あるいは阻害する物質の探索を行うことは、アルツハイマー病の新規対策になると考えられる。特に、星状細胞をターゲットとすることで、肝細胞において起こり得るケトアシドーシスの危険性を低下させ、ケトン体をターゲットとしたアルツハイマー病の新しい治療戦略が提案できる。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の新規治療戦略として、ケトン体を脳内エネルギー源として積極的に利用させること、あるいはケトン体生成を促進させる物質を摂取させること、あるいはケトン体生成を阻害する物質の摂取を抑制することが考えられる。本研究では、以下の3項目について検討を行った。



(1) 細胞培養系を用いたケトン体によるエネルギー生成 (ATP 生成) の確認

ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞を用いて、エネルギー源となるアセト酢酸、3β-ヒドロキシ酪酸あるいはグルコースを添加し、細胞内および細胞外の ATP 産生量を測定する。

(2) ケトン体添加に伴う細胞培養外液中のアミロイドβ42ペプチド(Aβ42)産生量の変化

ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞を用いて、エネルギー源となるアセト酢酸、3β-ヒドロキシ酪酸あるいはグルコースを添加後の細胞培養液上清中のアミロイドβ42ペプチド(Aβ42)産生量の変化を解析する。

(3) 細胞培養系を用いたケトン体生成を促進あるいは阻害する物質の探索

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて、ケ

トン体生成の鍵酵素の HMG-CoA リアーゼによって産生されることから、HMG-CoA リアーゼ活性を測定することによって、活性化あるいは阻害する物質の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養系を用いたケトン体によるエネルギー生成 (ATP 生成) の確認

ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞を播種し、10%FBS 含有 MEM 培地で 24 時間前培養後、アセト酢酸、3β-ヒドロキシ酪酸、グルコースあるいはコントロールとして MilliQ 水を添加し、72 時間培養後の細胞培養液上清中および細胞内の ATP 量を、D-ルシフェリンを基質とするルシフェラーゼ発光酵素法により定量した。

(2) ケトン体添加に伴う細胞培養外液中のアミロイドβ42ペプチド(Aβ42)産生量の変化

ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞を播種し、10%FBS 含有 MEM 培地で 24 時間前培養後、アセト酢酸、3β-ヒドロキシ酪酸、グルコースあるいはコントロールとして MilliQ 水を添加し、72 時間培養後の細胞培養液上清中の Aβ42 を酵素免疫測定法 (ELISA) により定量した。

(3) 細胞破砕液を用いたケトン体生成を促進あるいは阻害する物質の探索

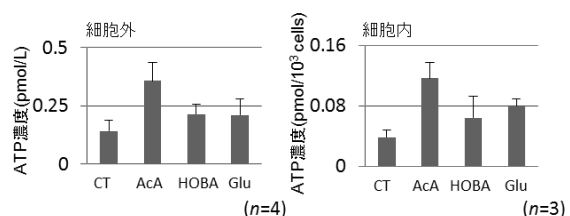
ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を試験管内で、細胞破砕を行い、細胞破砕液中の HMG-CoA リアーゼ活性を、酵素反応により生成されるアセト酢酸を定量する方法で行った。この際に、細胞培養液中あるいは酵素活性を測定中に、HMG-CoA リアーゼの生成を促進あるいは活性を阻害するポリフェノール類を検索した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養系を用いたケトン体によるエネルギー生成 (ATP 生成) の確認

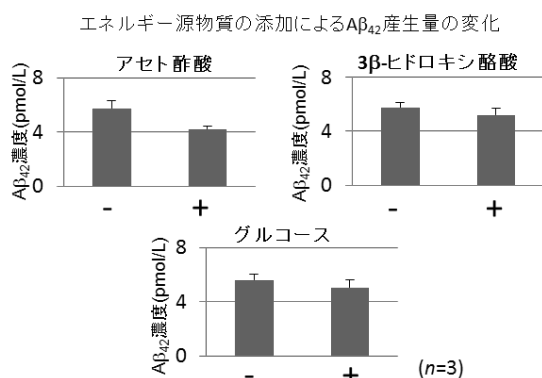
エネルギー源物質であるアセト酢酸、3β-ヒドロキシ酪酸あるいはグルコースを添加すると、細胞内および細胞外での ATP 濃度が増加した。特にアセト酢酸においては、細胞内外ともに ATP 濃度が大きく増加した。

エネルギー源物質の添加による細胞内外におけるATP産生量の変化



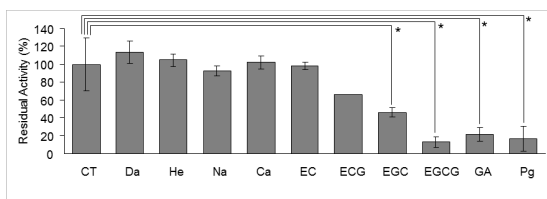
CT, コントロール; AcA, アセト酢酸; HOBA, 3β-ヒドロキシ酪酸; Glu, グルコース

(2) ケトン体添加に伴う細胞培養外液中のアミロイドβ42ペプチド(Aβ42)産生量の変化
細胞培養系に、アセト酢酸あるいは3β-ヒドロキシ酪酸を添加したところ、Aβ42産生量を有意に微減させた。



(3) 細胞破砕液を用いたケトン体生成を促進あるいは阻害する物質の探索

細胞培養液にポリフェノール類6種(ヘスペレチン:He、ダイゼイン:Da、カテキン:Ca、エピカテキン:EC、エピガロカテキン:EGCおよびエピガロカテキンガレート:EGCG)の添加に伴うHMG-CoAリアーゼの誘導能は認められなかったが、細胞破砕液中のHMG-CoAリアーゼ活性に及ぼす影響を上記6種に、ナリンギン:Na、エピカテキンガレート:ECG、没食子酸:Gaおよびピロガロール:PGを加えた10種について検討したところ、活性化は認められなかったが、カテキン類のECG、EGCおよびEGCG、特にEGCGに強い阻害作用が、また、GaおよびPGにも同様に強い阻害作用が認められた。



HMG-CoA リアーゼ活性に対する阻害が強く認められた ECG、EGC、EGCG、Ga および PG において Lineweaver-burk plot により阻害様式を求めた。その結果 ECG、EGC、EGCG、Ga および PG とそれぞれのコントロールは x および y 軸上での交点が存在せず、コントロールとポリフェノールのそれぞれの濃度が平行を示さないことより、混合型非競合阻害であると推察された。また、酵素化学的パラメータの K_i 値および 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求めたところ、EGCG は、 $IC_{50} = 42.4$ mM、 $K_i = 2.8$ mM と、カテキン類のなかで最も小さな値を示し、HMG-CoA リアーゼ阻害作用が最も強いという結果を得た。また、Ga および PG の強い阻害作用から、阻害作用におけるガリル基の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Nakagawa S, Kojima Y, Sekino K, Yamato S: Effect of polyphenols on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase activity in human hepatoma HepG2 cell extracts. *Biol Pharm Bull.*, 36(12), 1902-1906, 2013. (査読有)
2. Nakagawa S, Kuwabara N, Takamatsu Y, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S: Detection of CYP2C19 gene polymorphism from noninvasive samples by cycling probe technology. *Ann Clin Biochem.* 51(2), 298-300, 2013. (査読有)
3. Hirayama S, Nakagawa S, Soda S, Kamimura Y, Nishioka E, Ueno T, Fukushima Y, Higuchi K, Inoue M, Seino U, Ohmura H, Yamato S, Miida T: Ezetimibe decreases serum oxidized cholesterol without impairing bile acid synthesis in Japanese hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 230(1):48-51, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.06.016.
4. 佐藤 友美, 桑原 直子, 中川 沙織, 大和 進: 選択的固相抽出前処理法を用いるイソペンテニルピロリン酸とジメチルアリルピロリン酸との含量の LC-MS/MS 定量. *分析化学* 62(8):731-735, 2013. (査読有)
5. Nakagawa S, Watanabe M, Tanaka T, Yamato S: Measurement of cholesterol precursors and cholesterol in human hepatoma cells and effects of flavanones and isoflavones on cholesterol biosynthetic pathway. *Biochimica Clinica*, 37:S594, 2013. (査読有)
6. Yamato S, Nakagawa S, Kojima Y, Sekino K: Measurement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase Activity in human hepatoma HepG2 cell extracts and effects of polyphenols on its activity. *Biochimica Clinica*, 37:S607, 2013. (査読有)
7. Nakagawa S, Kuwabara N, Kobayashi H, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S: Simple column-switching HPLC method for determining levels of the antifungal agent micafungin in human plasma and application to patient samples. *Biomed. Chromatogr.* 27 (5):551-555, 2013. (査読有)
8. Hasegawa E, Nakagawa S, Miyate Y, Takahashi K, Ohta S, Tachikawa E, Yamato S: Inhibitory effect of protopanaxatriol ginseng metabolite M4 on the production of corticosteroids in ACTH-stimulated bovine adrenal fasciculata cells. *Life Sci.*

- 92(12):687-693, 2013. (査読有).
9. Hasegawa E, Nakagawa S, Sato M, Tachikawa E, Yamato S: Effect of polyphenols on production of steroid hormones from human adrenocortical NCI-H295R cells. *Biol Pharm Bull.* 36(2):228-237, 2013. (査読有)
 10. Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano KI, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ohtake A, Yamato S, Miida T: Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta* 416:54-59, 2013. (査読有)
 11. 中川 沙織、星 尚寛、久保 敦史、大和 進: 緑茶飲料中に含まれるポリフェノールの定量と茶葉の種類によるポリフェノール含量の違い, *分析化学* 62(1):51-55, 2013. (査読有)
 12. 長谷川 絵梨、中川 沙織、高橋 香織、大和 進: 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性に対するポリフェノールの保護効果, *日本補完代替医療学会誌* 9(1):65-68, 2012. (査読有)

[学会発表](計10件)

1. 中川 沙織、駒沢 圭佑、大和 進: コレステロール合成酵素 7-dehydrocholesterol reductase mRNA の発現量のフラバノン類による抑制作用, 日本薬学会第134年会(熊本), 2014年3月
2. 立川 英一、中川 沙織、大和 進、武井 正夫: 神経・内分泌・免疫系に影響を与える生薬成分 - In vitro で解析した薬用人蔘ジンセノシドの効き方 -, 第87回日本薬理学会年会(仙台), 2014年3月
3. 中川 沙織、佐藤 友美、桑原 直子、大和 進: リン脂質除去用の固相抽出前処理法を用いるイソペンテニルピロリン酸およびジメチルアリルピロリン酸含量のLC-MS/MS定量とその応用, 日本分析化学会 第62年会(大阪), 2013年9月
4. 中川 沙織、平山 哲、木村 晋也、三井田 孝、大和 進: 血漿中イソプレノイドのLC-MS/MS高感度定量, 第53回日本臨床化学会年次学術集会(徳島), 2013年8月
5. S. Nakagawa, M. Watanabe, T. Tanaka, S. Yamato. Measurement of cholesterol precursors and cholesterol in human hepatoma cells and effects of flavanones and isoflavones on cholesterol biosynthetic pathway. 20th

IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Milano, Italy), 2013 (19-23 May) **Selected poster.**

6. S. Yamato, S. Nakagawa, Y Kojima, K Sekino. Measurement of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase activity in human hepatoma HepG2 Cell extracts and effects of polyphenols on its activity. 20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Milano, Italy), 2013 (19-23 May)
7. 中川 沙織、倉田 遥、大和 進: 神経芽細胞腫由来脳細胞から産生されるアミロイドベータタンパク質(Aβ42)に対するケトン体の影響, 日本薬学会第133年会(横浜), 2013年3月
8. 三浦 睦美、佐藤 友美、桑原 直子、中川 沙織、大和 進: リン酸基を認識する固相抽出前処理法を用いたヒト血漿中イソプレノイド化合物の定量, 日本薬学会第133年会(横浜), 2013年3月
9. 小島 祐子、富田 潤、池田 佳子、関野 浩一、中川 沙織、大和 進: HMG-CoA リアーゼ活性に対するポリフェノールの作用, 日本薬学会第132年会(札幌), 2012年3月
10. 関野 浩一、富田 潤、池田 佳子、中川 沙織、大和 進: HepG2 細胞 HMG-CoA リアーゼに及ぼすエピガロカテキンガレートの抑制効果, 日本薬学会第131年会(静岡), 2011年3月

[図書](計1件)

1. 中川 沙織、大和 進: 第4章 抗ストレス食品の培養細胞による機能評価。抗ストレス食品の開発と展望、横越英彦監修、株式会社シーエムシー出版、48-60, 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nupals.ac.jp/labo/ph/analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 進 (YAMATO, Susumu)
新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 60057370

(2) 研究分担者

三井田 孝 (MIIDA, Takashi)
順天堂大学・医学研究科・教授
研究者番号: 80260545

立川 英一 (TACHIKAWA, Eiichi)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50146031

中川 沙織 (NAKAGAWA, Saori)
新潟薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：30410228